





Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрическим методом и методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах

О.Н. Колесникова , В.Е. Трегубова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсесянц

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

 Колесникова Оксана Николаевна; kolesnikovao@expmed.ru

Резюме

Количественное определение консерванта тиомерсала, входящего в состав ряда иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), является обязательным требованием к их качеству. Ранее нами была разработана методика количественного определения тиомерсала в несорбированных ИЛП, основанная на методе атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара (методика ААС ХП). **Цель работы:** анализ возможности применения методики ААС ХП для количественной оценки содержания тиомерсала в сорбированных препаратах и оценка сопоставимости результатов количественного определения тиомерсала, полученных с помощью колориметрической методики и методики ААС ХП. **Материалы и методы:** государственный стандартный образец содержания ионов ртути; фармакопейный стандартный образец (ФСО) содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427); образцы сорбированных ИЛП различных производителей (АКДС-вакцина, препараты анатоксинов, вакцины против гепатита В и гриппа, комбинированные вакцины). Исследование проводили с применением колориметрической методики в реакции с дити-зоном и методики ААС ХП. **Результаты:** полученные с использованием методики ААС ХП значения относительного стандартного отклонения (3,95%) и коэффициента корреляции «объем образца – содержание тиомерсала» (0,9956) подтверждают специфичность методики; регрессионный анализ и полученное значение *F*-критерия Фишера, равное 0,16, свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки методики. Диапазон процента выявления добавленного количества тиомерсала, не превышающий 10%, свидетельствует об удовлетворительной правильности методики. Установлена чувствительность методики ААС ХП: предел количественного определения и предел обнаружения ионов ртути в образце составили $6,9 \times 10^{-3}$ и $2,3 \times 10^{-3}$ мкг/мл соответственно. Значение критерия Фишера (1,29), полученное при оценке сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрической методикой и методикой ААС ХП, ниже табличного значения (3,96). **Выводы:** подтверждена возможность применения методики ААС ХП для количественного определения тиомерсала в сорбированных ИЛП. Установленный предел обнаружения методики позволяет оценивать остаточные количества тиомерсала в полупродуктах при производстве бесконсервантных форм ИЛП. Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрической методикой и методикой ААС ХП, проведенная с применением однофакторного дисперсионного анализа по критерию Фишера, показала возможность применения ФСО 3.1.00427 для контроля стабильности аналитической работы при производстве методики ААС ХП.

Ключевые слова: тиомерсал; консервант; атомно-абсорбционная спектрометрия; иммунобиологические лекарственные препараты; сорбированные препараты

Для цитирования: Колесникова О.Н., Трегубова В.Е., Устинникова О.Б., Мовсесянц А.А. Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрическим методом и методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):318–330. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-318-330>

Comparability assessment of the results of thiomersal quantification in adsorbed immunobiological medicinal products by colourimetry and by cold vapor atomic absorption spectrometry

O.N. Kolesnikova ✉, V.E. Tregubova, O.B. Ustinnikova, A.A. Movsesyants

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ *Oksana N. Kolesnikova; kolesnikovao@expmed.ru*

Abstract

To ensure the quality of immunobiologicals, it is required to quantify the thiomersal preservative present in a number of them. The authors have previously developed an analytical procedure for thiomersal quantification in non-adsorbed immunobiological medicinal products, which is based on cold vapor atomic absorption spectrometry (CV AAS). **The aim of the study** was to analyse the possibility of using the CV AAS procedure for thiomersal content determination in adsorbed immunobiologicals and evaluate the comparability of thiomersal quantification results obtained by colourimetry and CV AAS. **Materials and methods:** the study used the national reference standard of mercury ions content and the pharmacopoeial reference standard of thiomersal content in adsorbed medicinal products (PhRS 3.1.00427), as well as samples of immunobiologicals by different manufacturers: a DTP vaccine, anatoxins, hepatitis B and influenza vaccines, and combined vaccines. The study involved CV AAS and the colourimetric reaction between mercury and dithizone. **Results:** the specificity of the CV AAS procedure is demonstrated by the coefficient of variation (3.95%) and the coefficient of correlation between the test sample volume and thiomersal content (0.9956). The regression analysis and the Fisher's test value of 0.16 indicate the absence of bias. The trueness of the method is satisfactory, as the percent recovery differs from the total spiked amount by less than 10%. For the sensitivity of the CV AAS procedure, its quantification and detection limits are $6.9 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ and $2.3 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, respectively. The Fisher's test value obtained in the comparability assessment of the results of thiomersal quantification by colourimetry and CV AAS (1.29) is lower than the conventional tabulated one (3.96). **Conclusions:** according to the study, it is possible to use the CV AAS procedure for thiomersal quantification in adsorbed immunobiologicals. The established detection limit allows evaluating residual amounts of thiomersal in in-process intermediates during the production of preservative-free immunobiological dosage forms. The comparability assessment of the results of thiomersal quantification by colourimetry and CV AAS, carried out using one-way ANOVA and Fisher's test, showed the possibility of using PhRS 3.1.00427 to control the consistency of operation when reproducing the CV AAS procedure.

Key words: thiomersal; preservative; atomic absorption spectrometry; immunobiologicals; adsorbed preparations

For citation: Kolesnikova O.N., Tregubova V.E., Ustinnikova O.B., Movsesyants A.A. Comparability assessment of the results of thiomersal quantification in adsorbed immunobiological medicinal products by colourimetry and by cold vapor atomic absorption spectrometry. *БИОпрепараты. Профилактика,*

diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2022;22(3):318–330.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-318-330>

Введение

Тиомерсал (мертиолят) – ртутьорганическое соединение, обладающее антисептическими и инактивирующими свойствами, разрешенное к использованию в качестве консерванта при производстве иммунобиологических препаратов (ИЛП). Наличие консерванта обеспечивает защиту данных препаратов от контаминации в процессе их производства, хранения, транспортировки и применения¹.

До недавнего времени тиомерсал был самым распространенным консервантом. В настоящий момент, несмотря на то что эффективность тиомерсала в 40–50 раз выше, чем у фенола, Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США, Всемирная организация здравоохранения и другие регуляторные органы рекомендуют ограничивать его применение, чтобы уменьшить общую дозу тиомерсала, получаемого со всеми прививками² [1–9]. Кроме того, данная рекомендация связана с увеличением содержания ртути в продуктах питания, особенно морепродуктах из-за общей неблагоприятной экологической ситуации [1, 8, 9]. В настоящее время применение тиомерсала остается актуальным для многодозовых форм некоторых вакцин, в которых применение фенола невозможно из-за его инактивирующего действия на антигены³ [1, 10].

Тиомерсал входит в состав таких препаратов, как АКДС-вакцины и препараты анатоксинов, вакцины против гепатита В и гриппа, комбинированные вакцины отечественного и зарубеж-

ного производства. Содержание тиомерсала в готовых формах ИЛП находится в пределах от 30 до 120 мкг/мл² [1, 10]. Кроме готовых форм тиомерсал применяется в качестве инактивирующего агента в процессе производства и в качестве консерванта для полупродуктов препаратов, готовые формы которых имеют статус бесконсервантных⁴. Все вышеуказанные препараты, за исключением гриппозных вакцин, содержат в качестве адъюванта гель соединений алюминия в количестве от 0,35 до 1,1 мг/мл в зависимости от типа препарата.

Методики количественного определения тиомерсала в ИЛП, как правило, основаны на определении ртути. Традиционной методикой контроля количественного содержания тиомерсала является колориметрическая методика в реакции с дитизоном⁵. Однако в последнее время наблюдается тенденция перехода на более высокотехнологичные методы количественного анализа, одним из которых является элементный анализ. В качестве альтернативного способа определения тиомерсала в ИЛП может быть использован метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС ХП), который предполагает применение современного высокочувствительного оборудования, позволяющего частично автоматизировать анализ и увеличить пропускную способность метода, уменьшить влияние оператора на результаты анализа и обеспечить прослеживаемость работы в соответствии с требованиями к аккредитованным лабораториям⁶.

¹ Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/2517/00). EMA; 2001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/points-consider-reduction-elimination-substitution-thiomersal-vaccines_en.pdf

Thimerosal and Vaccines. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm-096228.htm#toc>

Immunization safety review: vaccines and autism. Institute of Medicine Immunization Safety Review Committee. Washington: National Academies Press; 2004.

Global Advisory Committee on Vaccine Safety, June 2012. WHO; 2012. <https://www.who.int/publications/i/item/WER8730>

² Там же.

³ Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/2517/00). EMA; 2001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/points-consider-reduction-elimination-substitution-thiomersal-vaccines_en.pdf

Thimerosal and Vaccines. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm-096228.htm#toc>

⁴ Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/2517/00). EMA; 2001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/points-consider-reduction-elimination-substitution-thiomersal-vaccines_en.pdf

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0025.18 Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁶ ГОСТ ISO/IEC17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

Ранее авторами была разработана методика количественного определения тиомерсала по атомарной ртути для несорбированных иммунобиологических препаратов [11]. Методика основана на методе атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара (методика ААС ХП) с применением атомно-абсорбционного анализатора ртути с проточно-инжекционной системой. В процессе разработки условий пробоподготовки образцов был подобран состав реакционной смеси и режим минерализации, а также степень разведения образцов. В результате сравнительного определения тиомерсала колориметрическим методом и методом ААС ХП было выявлено отсутствие статистически значимых различий полученных данных.

Однако применение данной методики для определения тиомерсала в препаратах, содержащих адъювант – гель гидроксида алюминия, требует подтверждения ее пригодности, поскольку нельзя исключить возможное неспецифическое влияние высоких концентраций ионов алюминия на определение ионов ртути.

Кроме того, анализ сопоставимости результатов определения тиомерсала методикой ААС ХП и фармакопейной колориметрической методикой позволит решить вопрос внутрилабораторного контроля качества, а именно – оценить возможность использования фармакопейного стандартного образца (ФСО) содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427), аттестованного колориметрической методикой и предназначенного для контроля стабильности аналитической работы⁷.

Цель работы – анализ возможности применения методики ААС ХП для количественной оценки содержания тиомерсала в сорбированных препаратах и оценка сопоставимости результатов количественного определения тиомерсала, полученных с помощью колориметрической методики и методики ААС ХП.

Материалы и методы

Материалы:

- государственный стандартный образец (ГСО) содержания ионов ртути (8004-93, ГДВИ.410408.009ПС);
- ФСО содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427);
- тиомерсал (Sigma Aldrich, кат. № Т4687) (го-

товили растворы тиомерсала с концентрацией 50, 100, 150 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе (ФБР), в растворе натрия хлорида 0,9% и в воде).

Образцы препаратов:

- образец 1: АКДС-вакцина (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 6);
- образец 2: АС-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 6);
- образец 3: АДС-М-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 4);
- образец 4: Анатоксин стафилококковый (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, филиал «Медгамал») (число серий препарата – 4);
- образец 5: АД-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 4);
- образец 6: АД-М-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 4);
- образец 7: Бубо®-Кок, вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В (ЗАО МПК «Комбиотех», Россия) (число серий препарата – 2);
- образец 8: вакцина АКДС-Геп В, бесконсервантная форма (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 3);
- образец 9: АКДС-вакцина, бесконсервантная форма (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 2);
- образец 10: Тетраанатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 1);
- образец 11: АКДС-Геп В (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 1);
- образец 12: Совигрипп® (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата – 1);
- образец 13: Ультрикс® (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России) (число серий препарата – 1).

Оборудование:

- атомно-абсорбционный анализатор ртути методом холодного пара FIMS-400 (PerkinElmer), оснащенный кварцевой абсорбционной ячейкой и проточно-инжекционной системой с программным обеспечением AAWinLab (PerkinElmer);
- спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония);
- весы аналитические XSE205 Dual Range (Mettler Toledo AG, Швейцария).

Методы

Атомно-абсорбционный метод спектрометрии холодного пара (ААС ХП) основан

⁷ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0025.18 Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

на способности восстановленных атомов ртути выделяться в виде пара [11]. Методика разработана для приборов с проточно-инжекционной системой, при помощи которой происходит смешивание испытуемых проб с реакционной смесью, в результате чего высвобождаются пары восстановленной атомарной ртути, которые, попадая в измерительную ячейку, абсорбируют ультрафиолетовое излучение при длине волны 253,7 нм. Величина абсорбции – аналитический сигнал, детектируемый прибором, который прямо пропорционален концентрации паров ртути. Реагенты для минерализации: серная кислота 50%, перманганат калия 5%, сульфат гидроксилamina 20%. Калибровочная характеристика: растворы ГСО ионов ртути с концентрациями от 10 до 40 мкг/л с шагом 5 мкг/л.

Количество тиомерсала рассчитывали по формуле (1):

$$C = \frac{X \times A \times 100}{N \times 49,55 \times 1000}, \quad (1)$$

где C – концентрация тиомерсала, мкг/мл; X – концентрация ртути, найденная по градуировочному графику, мкг/л; N – объем препарата, взятый на испытание, мкл; 1000 – пересчет концентрации в мкг/мл; 100/49,55 – коэффициент пересчета концентрации ртути на тиомерсал.

Колориметрическая методика определения тиомерсала в реакции с дитизоном основана на выделении ионов ртути и последующей реакции с дитизоном в безводной фазе с образованием комплекса дитизоната ртути⁸. Детектирование проводили при длине волны 597 нм.

Для обработки полученных результатов использовали статистические методы расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации, а также однофакторный дисперсионный анализ с расчетом критерия Фишера, сравнение двух групп данных с расчетом критерия Стьюдента, регрессионный анализ с расчетом критерия Фишера [12, 13].

Результаты и обсуждение

Количественное определение тиомерсала в сорбированных иммунобиологических препаратах с применением методики ААС ХП

Выбор рабочего диапазона методики ААС ХП при ее разработке для несорбированных препаратов был основан на чувствительности

оборудования и содержании тиомерсала в испытуемых образцах. Статистически был обоснован диапазон концентрации ионов ртути от 10 до 40 нг/мл [11]. Поскольку требование к содержанию тиомерсала для несорбированных и сорбированных препаратов совпадают, было принято решение об использовании данного диапазона.

Оптимизированная для несорбированных препаратов пробоподготовка, заключающаяся в уменьшении объема реакционной смеси по сравнению с колориметрическим методом, была использована для сорбированных препаратов, поскольку гель гидроксида алюминия подвержен минерализации в присутствии серной кислоты и перманганата калия.

В целом, за исключением наличия геля гидроксида алюминия, состав сорбированных и несорбированных препаратов не имеет существенных отличий, способных оказать влияние на метрологические характеристики методики (препараты обоих типов содержат белковый компонент, буферные растворы различного состава, а также возможно наличие остаточного формальдегида).

Для оценки возможности применения методики определения тиомерсала ААС ХП, разработанной и валидированной ранее для контроля тиомерсала в несорбированных препаратах, проводили испытания образцов, содержащих гель гидроксида алюминия в качестве адьюванта (табл. 1).

Количество тиомерсала, определяемое методикой ААС ХП в исследуемых образцах, соответствовало требованиям нормативной документации, включая образцы бесконсервантных препаратов.

Оценка специфичности методики определения тиомерсала методом ААС ХП

Оценку специфичности методики⁹, в том числе влияния геля гидроксида алюминия, на результат определения тиомерсала методом ААС ХП проводили, анализируя пробы, содержащие образец 1 (с теоретическим содержанием тиомерсала 100±15 мкг/мл и ионов алюминия около 1,0 мг/мл) в объеме от 10 до 40 мкл с шагом 5 мкл с добавлением 0,15 мл 50% раствора серной кислоты, 0,7 мл 50% раствора калия перманганата и 0,2 мл 20% раствора гидроксилamina сульфата. Общий объем

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0025.18 Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Испытание сорбированных вакцин на содержание тиомерсала с использованием методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара

Table 1. Testing of adsorbed vaccines for thiomersal content by cold vapor atomic absorption spectrometry

Номер образца (количество серий) <i>Sample number (number of batches)</i>	Требование НД к содержанию тиомерсала, мкг/мл <i>Product specification requirements for thiomersal content, µg/mL</i>	Среднее значение содержа- ния тиомерсала, мкг/мл <i>Average thiomersal content, µg/mL</i>	Диапазон значений содержания, мкг/мл <i>Content range, µg/mL</i>
Образцы вакцин, содержащие тиомерсал <i>Samples of thiomersal-containing vaccines</i>			
Образец 1 (6 серий) <i>Sample 1 (6 batches)</i>	85–115	98	88,7–105,0
Образец 2 (6 серий) <i>Sample 2 (6 batches)</i>		89	85,2–94,4
Образец 3 (4 серии) <i>Sample 3 (4 batches)</i>		92	86,8–94,0
Образец 4 (4 серии) <i>Sample 4 (4 batches)</i>		95	91,6–98,9
Образец 5 (4 серии) <i>Sample 5 (4 batches)</i>		86,2	85,2–87,1
Образец 6 (4 серии) <i>Sample 6 (4 batches)</i>		85,6	85,0–86,3
Образец 7 (2 серии) <i>Sample 7 (2 batches)</i>	70–100	76	73,9–77,7
Образцы бесконсервантных вакцин <i>Samples of preservative-free vaccines</i>			
Образец 8 (3 серии) <i>Sample 8 (3 batches)</i>	Должен отсутствовать <i>No thiomersal present</i>	Ниже предела обнаружения <i>Below the detection limit</i>	–
Образец 9 (2 серии) <i>Sample 9 (2 batches)</i>		Ниже предела обнаружения <i>Below the detection limit</i>	–

Примечание. НД – нормативная документация; «–» – неприменимо.
Note. – not applicable.

реакционной смеси – 50 мл. За результат, полученный для каждой пробы, принимали среднее значение трех независимых испытаний (табл. 2, рис. 1).

Увеличение объема образца, то есть увеличение концентрации тиомерсала и геля гидроксида алюминия в составе пробы (табл. 2), приводит к возрастанию величины аналитического сигнала и не влияет на выявление содержания тиомерсала в пересчете на разведение образца. При этом полученное относительное стандартное отклонение 3,95 соответствует относительному стандартному отклонению методики, полученному в ходе ее разработки для несорбированных препаратов – 3,94 [11].

В то же время регрессионная зависимость величины аналитического сигнала от объема образца (содержания тиомерсала в пробе) имеет линейный характер и коэффициент корреляции 0,991 (рис. 1).

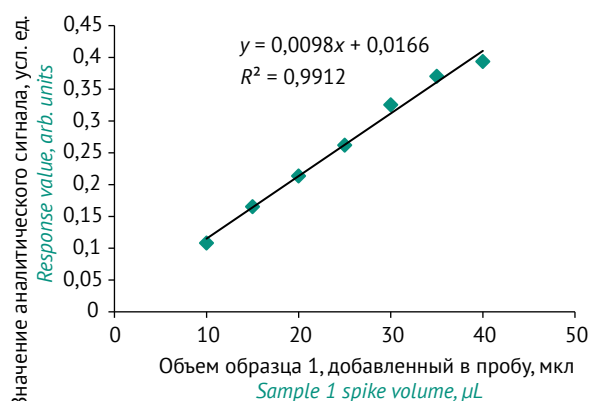


Рис. 1. Регрессионная зависимость величины аналитического сигнала от объема образца 1, полученная с использованием методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара.

Fig. 1. The regression curve for the relationship between the response values obtained by cold vapor atomic absorption spectrometry and the volume of sample 1 spikes in the test sample.

Таблица 2. Оценка специфичности методики определения тиомерсала методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара**Table 2.** Evaluation of the specificity of the cold vapor atomic absorption spectrometry procedure for thiomersal quantification

Объем образца 1, мкл Sample 1 volume, μL	D ($n=3$)	X , мкг/л $\mu\text{g/L}$	C , мкг/мл $\mu\text{g/mL}$	Среднее значение содержания тиомерсала, мкг/мл Average thiomersal content, $\mu\text{g/mL}$	Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, $\mu\text{g/mL}$	Относительное стандартное отклонение, % Coefficient of variation, %	r
10	0,1082	8,74	88,2	94,24	3,72	3,95	0,9956
15	0,1654	14,17	95,5				
20	0,2136	18,78	94,8				
25	0,2620	23,39	94,4				
30	0,3255	29,44	99,0				
35	0,3704	33,71	97,2				
40	0,3935	35,91	90,6				

Примечание. D – среднее значение величины аналитического сигнала ($n=3$); X – содержание ионов ртути в пробе, рассчитанное по калибровочной характеристике; C – содержание тиомерсала в образце 1 с учетом разведения; r – коэффициент корреляции «Объем образца 1 – Содержание тиомерсала, рассчитанное по калибровке».

Note. D —mean response ($n=3$); X —mercury ion content in the sample, calculated using a calibration curve; C —thiomersal content in sample 1, adjusted for the dilution; r —coefficient of correlation between the volume of Sample 1 and the thiomersal content calculated from the calibration curve.

Оценка систематической ошибки методики определения тиомерсала с применением метода ААС ХП

Доказательство отсутствия систематической ошибки находили с помощью регрессионного анализа и расчета F -критерия Фишера (рис. 2, табл. 3). Для этого строили регрессионную зависимость методом наименьших квадратов между теоретическими (x_i) и найденными (y_i) значениями концентраций тиомерсала в каждом растворе. Теоретические значения определяли методом расчета, принимая за содержание тиомерсала в образце среднее значение ($n=21$) – 94,24 мкг/л. Статистическую незначимость коэффициента сдвига (свободного члена уравнения), характеризующего систематическую ошибку метода, определяли, рассчитывая критерий Фишера по формуле (2) [14]:

$$F(P, f_1=n-1, f_2=n-2) = \frac{S_{0,1}^2(n-1) - S_{0,2}^2(n-2)}{S_{0,2}^2(n-2)}, \quad (2)$$

где S – дисперсии, полученные при обчете зависимостей без свободного члена и со свободным членом соответственно и рассчитанные по формулам (3) и (4):

$$S_{0,1}^2 = (\sum y_i^2 - b \sum x_i y_i) / (n-1) = 0,00913855, \quad (3)$$

$$S_{0,2}^2 = (\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i) / (n-2) = 0,00943465, \quad (4)$$

где a – свободный член регрессионной зависимости, b – коэффициент наклона, n – количество точек [13].

Критическое табличное значение при доверительной вероятности 95% со степенями свободы $f_1=6, f_2=5$ составляет $F_{\text{крит}}=4,95$. Рассчитанное значение критерия Фишера с использованием уравнения (2) – $F(95\%, f_1=6, f_2=5)=0,16$ ниже критического значения, что показывает статистическую незначимость коэффициента a и отсутствие систематической ошибки определения тиомерсала в сорбированных препаратах методикой ААС ХП с вероятностью, равной 95%.

Оценка правильности определения тиомерсала методикой ААС ХП

Оценку правильности проводили, анализируя пробы, содержащие помимо реагентов для минерализации образцы препаратов с добавлением известного количества тиомерсала (модельная смесь с известным содержанием определяемого вещества)¹⁰. Исследовали образцы сорбированных препаратов (образцы 1–4 и 10), образец несорбированного препарата 12 и растворы тиомерсала с известными концентрациями 50, 100 и 150 мкг/мл, в ФБР pH 7,2. Для каждого образца и раствора готовили пробы, содержащие 10, 20 и 40 мкг добавленного тиомерсала, и пробу без его добавления. Рассчитывали процент выявления тиомерсала. За результат, полу-

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

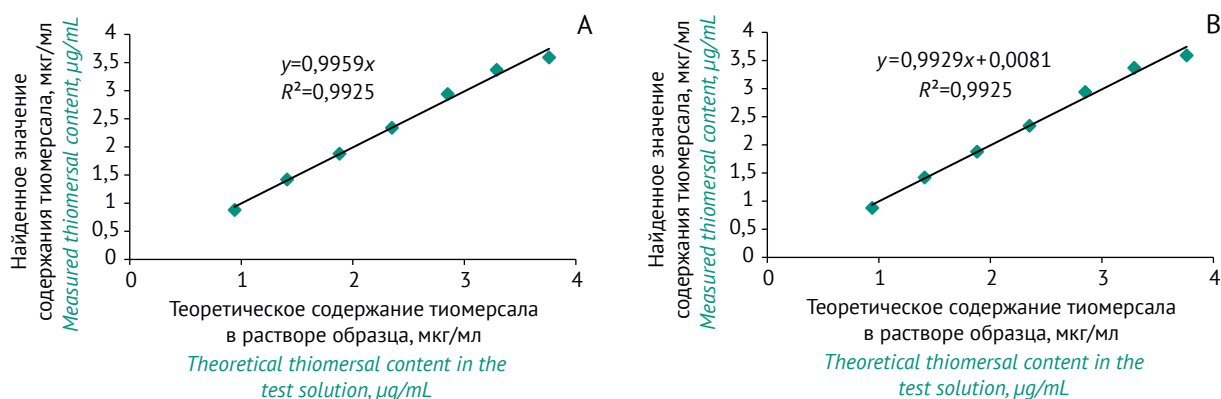


Рис. 2. Регрессионная зависимость между теоретическими (x_i) и найденными (y_i) значениями концентраций тиомерсала с использованием метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара, без свободного члена уравнения (А), со свободным членом уравнения (В).

Fig. 2. The regression curve for the relationship between theoretical (x_i) and measured (y_i) thiomersal concentrations obtained using cold vapor atomic absorption spectrometry, without the intercept term (A) and with the intercept term (B).

ченный для каждой пробы, принимали среднее значение трех независимых испытаний. За ожидаемое значение концентрации в исследуемом образце принимали расчетное суммарное значение концентрации: количество, найденное в образце (без добавки), и известное количество тиомерсала, добавленное в пробу (табл. 4).

Анализ результатов (табл. 4) показывает, что процент выявления тиомерсала в сорбированных образцах находится в диапазоне от 93,1 до 106,7%; процент выявления тиомерсала в несорбированном образце и растворах находится в диапазоне от 90,9 до 108,8%. Оба диапазона процента выявления не превышают 10% от ожидаемой величины. Полученные дан-

ные подтверждают, что присутствие алюминия в высоких концентрациях в сорбированных препаратах не влияет на точность количественного определения тиомерсала.

Предел количественного определения и предел обнаружения

Для подтверждения возможности применения методики ААС ХП для определения следовых количеств тиомерсала рассчитывали предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО) ионов ртути в образце по следующим формулам: $ПО=3,3 \times S/b$ и $ПКО=10 \times S/b$, где S – стандартное отклонение коэффициента сдвига, b – среднее арифметическое значение

Таблица 3. Оценка систематической ошибки методики определения тиомерсала с применением метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара

Table 3. Evaluation of the bias of the procedure for thiomersal quantification using cold vapor atomic absorption spectrometry

Растворы образца <i>Sample solutions</i>	Теоретическое значение содержания тиомерсала (x_i), мкг/мл <i>Theoretical thiomersal content (x_i), µg/mL</i>	Найденное значение содержания тиомерсала (y_i), мкг/мл <i>Measured thiomersal content (y_i), µg/mL</i>	Уравнения регрессионной зависимости между значениями x_i и y_i без учета (А) и с учетом (В) коэффициента сдвига <i>Regression curve for the relationship between x_i and y_i, without the intercept (A) and with it (B)</i>
1	0,94	0,88	$y=0,9959x$ (A) $R^2=0,9925$
2	1,41	1,42	
3	1,88	1,88	
4	2,35	2,34	$y=0,9929x+0,0081$ (B) $R^2=0,9925$
5	2,85	2,94	
6	3,29	3,37	
7	3,76	3,59	

Таблица 4. Расчет процента выявления тиомерсала в испытуемом растворе с использованием методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара**Table 4.** Calculation of thiomersal percent recovery from the test solution using cold vapor atomic absorption spectrometry

Исследуемый образец <i>Test sample</i>	Добавленное количество тиомерсала, мкг <i>Spiked amount of thiomersal, µg</i>	Концентрация тиомерсала в испытуемом образце, мкг/мл <i>Thiomersal concentration in the test sample, µg/mL</i>	Процент выявления, % <i>Percent recovery, %</i>
Образец 1, предварительно разведенный 1:1 <i>Sample 1, pre-diluted, 1:1</i>	0	44,7	–
	10	53,3	97,4
	20	65,3	100,9
	40	85,6	101,1
Образец 2, предварительно разведенный 1:1 <i>Sample 2, pre-diluted, 1:1</i>	0	45,5	–
	10	56,6	102,0
	20	69,8	106,6
	40	90,7	106,1
Образец 3, предварительно разведенный 1:1 <i>Sample 3, pre-diluted, 1:1</i>	0	46,1	–
	10	56,5	100,7
	20	68,0	102,9
	40	91,9	106,7
Образец 4 <i>Sample 4</i>	0	107,2	–
	10	116,1	99,1
	20	124,4	97,8
	40	141,3	96,0
Образец 10 <i>Sample 10</i>	0	89,8	–
	10	93,6	93,8
	20	105,5	96,1
	40	120,9	93,1
Образец 11 <i>Sample 11</i>	0	93	–
	10	102,2	99,2
	20	104,1	92,1
	40	120,9	90,9
Растворы тиомерсала известной концентрации в ФБР pH 7,2 <i>Thiomersal spiking solutions in PBS, pH 7.2</i>	50 мкг/мл <i>50 µg/mL</i>	53,98	108,0
	100 мкг/мл <i>100 µg/mL</i>	108,84	108,8
	150 мкг/мл <i>150 µg/mL</i>	152,52	101,7

Примечание. ФБР – фосфатно-солевой буферный раствор; «–» – неприменимо.

Note. PBS – phosphate-buffered saline; – not applicable.

коэффициента наклона калибровочной характеристики¹¹ (табл. 5).

Согласно формулам расчета методика имеет следующие характеристики:

$$ПО=0,005872 \times 3,3/0,0171=1,13 \text{ мкг/л,}$$

$$ПКО=0,005872 \times 10/0,0171=3,43 \text{ мкг/л,}$$

что в пересчете на тиомерсал составляет $2,3 \times 10^{-3}$ и $6,9 \times 10^{-3}$ мкг/мл соответственно. Таким образом, чувствительность методики подтверждает возможность ее применения для обнаружения следовых количеств тиомерсала в готовых бесконсервантных формах.

Таблица 5. Уравнения регрессионной зависимости аналитического сигнала от концентрации ионов ртути для методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара

Table 5. Regression equations for the relationship between the response and concentrations of mercury ions observed with cold vapor atomic absorption spectrometry

Уравнение регрессионной зависимости <i>Regression equation</i>	Коэффициент детерминации (R^2) <i>Coefficient of determination (R^2)</i>	Среднее значение углового коэффициента <i>Mean slope value</i>	Стандартное отклонение свободного члена уравнения <i>Standard deviation of the intercept</i>
$y=0,0175x+0,0253$	0,9919	0,0171	0,0059
$y=0,0166x+0,0260$	0,9923		
$y=0,0170x+0,0231$	0,9955		
$y=0,0178x+0,0171$	0,9991		
$y=0,0160x+0,0176$	0,9931		
$y=0,0178x+0,0171$	0,9960		
$y=0,0169x+0,0176$	0,9963		
$y=0,0170x+0,0130$	0,9950		
$y=0,0174x+0,0071$	0,9994		
$y=0,0170x+0,0133$	0,9979		

Таблица 6. Результаты сравнительных испытаний определения тиомерсала методикой атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара и колориметрической методикой

Table 6. Results of comparative thiomersal determinations using cold vapor atomic absorption spectrometry and colourimetry

Исследуемый образец <i>Test sample</i>	Значение содержания тиомерсала, определяемого методикой, мкг/мл <i>Thiomersal content determined by one of the following methods, µg/mL</i>		Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	RSD, %
	колориметрическая методика <i>Colourimetry</i>	методика атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара <i>Cold vapor atomic absorption spectrometry</i>		
Образец 1 <i>Sample 1</i>	109,8	114,8	3,5	3,1
Образец 2 <i>Sample 2</i>	99,6	99,5	0,1	0,1
Образец 3 <i>Sample 3</i>	102,9	94,2	6,2	6,2
Образец 10 <i>Sample 10</i>	97,7	88,2	6,4	6,9
Образец 11 <i>Sample 11</i>	89,5	92,2	1,9	2,1
Образец 12 <i>Sample 12</i>	88,2	88,8	0,4	0,5
Образец 13 <i>Sample 13</i>	102,4	105,5	2,2	2,1

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Сравнительный анализ результатов испытаний образцов колориметрической методикой и методикой ААС ХП

Сравнительные испытания колориметрической и ААС ХП методик проводили с применением образцов, отличающихся составом действующих и вспомогательных веществ, в том числе наличием геля гидроксида алюминия (образцы 1–3, 10, 11).

За результат содержания тиомерсала в каждом из образцов принимали среднее значение двух независимых параллельных измерений. Рассчитывали стандартное отклонение между значениями, полученными двумя методиками (табл. 6).

Результаты, представленные в таблице 6, отличаются не более чем на 6,9% для сорбированных и несорбированных препаратов. Полученные данные также подтверждают специфичность

и точность определения тиомерсала методом ААС ХП в сорбированных препаратах.

Оценка сопоставимости методик и возможности применения фармакопейного стандартного образца содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427), аттестованного колориметрической методикой, для методики ААС ХП

Для оценки сопоставимости результатов определения тиомерсала использовали результаты анализа ФСО 3.1.00427, полученные колориметрической методикой и методикой ААС ХП с помощью однофакторного дисперсионного анализа, рассчитывая значение критерия Фишера. Определяли наличие статистически значимых отличий двух равнозначных выборок ($n=40$ для каждой выборки) (табл. 7).

Таблица 7. Статистические показатели при сравнительном анализе определения тиомерсала с использованием колориметрической методики и методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара

Table 7. Statistical indicators for the comparative analysis of thiomersal determinations using colourimetry and cold vapor atomic absorption spectrometry

Наименование статистического показателя <i>Statistical indicator</i>		Значение статистического показателя, определяемого методикой <i>Statistical indicator value determined by one of the following methods</i>	
		Методика атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара <i>Cold vapor atomic absorption spectrometry</i>	Колориметрическая методика <i>Colourimetry</i>
Среднее значение ($n=40$), мкг/мл <i>Mean ($n=40$), $\mu\text{g/mL}$</i>	\bar{X}_{cp}	89,06	87,80
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, $\mu\text{g/mL}$</i>	S	4,89	5,06
Дисперсия <i>Variance, $\mu\text{g/mL}$</i>	S^2	23,9	25,6
Среднее значение по двум выборкам ($n=40$ для каждой), мкг/мл <i>Mean for both methods ($n=40$ for each), $\mu\text{g/mL}$</i>	\bar{X}_{cp}	88,43	
Стандартное отклонение средних значений, мкг/мл <i>Standard deviation of means, $\mu\text{g/mL}$</i>	S_{cp}	0,89	
Дисперсия средних <i>Variance of means</i>	S^2	0,80	
Внутригрупповая дисперсия <i>Intra-group variance</i>	$S_{\text{внут}}$	24,76	
Межгрупповая дисперсия <i>Inter-group variance</i>	$S_{\text{меж}}$	31,83	
Значение критерия Фишера <i>Fisher's test value</i>	F	1,29	
Межгрупповое число степеней свободы <i>Inter-group number of degrees of freedom</i>	$V_{\text{меж}}$	1	
Внутригрупповое число степеней свободы <i>Intra-group number of degrees of freedom</i>	$V_{\text{внут}}$	78	
Табличное значение критерия Фишера (доверительная вероятность 0,95) <i>Tabulated F-value (confidence level of 0.95)</i>	$F_{\text{крит}}$	3,96	

Согласно статистическим расчетам, представленным в таблице 7, полученное экспериментальное значение критерия Фишера, равное 1,29, ниже критического табличного значения (3,96), что говорит об отсутствии статистически значимых различий между двумя выборками.

Была проведена статистическая оценка двух групп данных (результатов, полученных с применением методики ААС ХП и колориметрической методики) с помощью критерия Стьюдента, используя величины средних выборочных значений и значений выборочных дисперсий, указанных в таблице 7. Расчетная величина критерия Стьюдента составила 1,14; что при табличном значении критерия Стьюдента, равном 2,021 (для выборки $n=40$ и доверительной вероятности 0,95), также свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий между выборками.

Полученные данные сравнительного анализа подтверждают правильность определения тиомерсала методикой ААС ХП.

Таким образом, оценка сопоставимости результатов, полученных методикой ААС ХП и колориметрической методикой, подтверждает возможность использования ФСО 3.1.00427 содержания мертиолята в сорбированных препаратах, аттестованного колориметрической методикой (с диапазоном содержания тиомерсала 82,34–96,72 мкг/мл, при доверительной вероятности 0,95) при воспроизведении методики ААС ХП.

олята в сорбированных препаратах, аттестованного колориметрической методикой (с диапазоном содержания тиомерсала 82,34–96,72 мкг/мл, при доверительной вероятности 0,95) при воспроизведении методики ААС ХП.

Заключение

Подтверждена пригодность методики ААС ХП для количественного определения тиомерсала в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах. Чувствительность методики, установленная как предел обнаружения, равный $2,3 \times 10^{-3}$ мкг/мл, позволяет использовать методику для оценки остаточных количеств тиомерсала в бесконсервантных препаратах в случае применения тиомерсала в технологическом процессе на стадиях промежуточных продуктов.

Оценка сопоставимости результатов, полученных колориметрической методикой и методикой ААС ХП, подтверждает отсутствие статистически значимых различий между двумя равнозначными выборками данных. Это позволяет использовать ФСО 3.1.00427 содержания мертиолята в сорбированных препаратах для контроля стабильности аналитической работы при воспроизведении методики ААС ХП.

Литература/References

1. Baker JP. Mercury, vaccines, and autism: one controversy, three histories. *Am J Public Health*. 2008;98(2):244–53. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2007.113159>
2. Wolfe RM, Sharp LK. Anti-vaccinationists past and present. *BMJ*. 2002;325(7361):430–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7361.430>
3. Wiedermann U, Garner-Spitzer E, Wagner A. Primary vaccine failure to routine vaccines: why and what to do? *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(1):239–43. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1093263>
4. Sugarman SD. Cases in vaccine court—legal battles over vaccines and autism. *N Engl J Med*. 2007;357(13):1275–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMp078168>
5. Pichichero ME, Cernichiari E, Lopreiato J, Treanor J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. *Lancet*. 2002;360(9347):1737–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11682-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11682-5)
6. Pichichero ME, Gentile A, Giglio N, Umido V, Clarkson T, Cernichiari E, et al. Mercury levels in newborns and infants after receipt of thiomersal-containing vaccines. *Pediatrics*. 2008;121(2):e208–14. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3363>
7. Pichichero ME, Gentile A, Giglio N, Alonso MM, Fernandez Mentaberry MV, Zareba G, et al. Mercury levels in premature and low birth weight newborn infants after receipt of thiomersal-containing vaccines. *J Pediatr*. 2009;155(4):495–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.04.011>
8. da Cunha GK, de Matos MB, Trettim JP, Rubin BB, de Avila Quevedo L, Pinheiro KAT, et al. Thiomersal-containing vaccines and deficit in child development: population-based study in southern Brazil. *Vaccine* 2020;38(9):2216–20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.044>
9. Kern JK, Geier DA, Homme KG, Geier MR. Examining the evidence that ethylmercury crosses the blood-brain barrier. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020;74:103312. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103312>
10. Hinman AR, Orenstein WA, Schuchat A. Vaccine-preventable diseases, immunizations, and MMWR — 1961–2011. *MMWR Suppl*. 2011;60(4):49–57.
11. Колесникова ОН, Устинникова ОВ, Рунова ОВ, Бондарев ВП. Определение мертиолята в несорбированных ИЛП методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС ХП) по ионам ртути. Часть 1: отработка методики и оценка статистической значимости результатов определения ртути колориметрическим методом и методом ААС-ХП. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(2):59–63. [Kolesnikova ON, Ustinnikova OB, Runova OB, Bondarev VP. Determination of thiomersal in non-adsorbed immunobiological preparations by cold vapor atomic absorption spectroscopy (CV AAS) for the ions of mercury. Part 1: method development and evaluation of statistical significance of differences in the results of mercury ions determination by colorimetric method and

- cold vapor atomic absorption spectroscopy method. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(2):59–63 (In Russ.)]
12. Glantz SA, ed. *Primer of biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1992.
13. Doerffel K. *Statistik in der analytischen Chemie*. Leipzig: Dt. Verl. für Grundstoffindustrie; 1990.
14. Эпштейн НА. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2004;38(4):40–56. [Epstein NA. Suitability evaluation (validation) of HPLC methods in pharmaceutical analysis (Review). *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2004;38(4):40–56]

Вклад авторов. *О.Н. Колесникова* – формирование цели и задач исследования, выполнение экспериментальных исследований по всем разделам рукописи, статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; *В.Е. Трегубова* – выполнение экспериментальных работ в части оценки сопоставимости методик; *О.Б. Устинникова* – концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; *А.А. Мовсесянц* – концепция исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. А.А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contribution. *O.N. Kolesnikova*—formulation of the aim and objectives of the study, execution of experiments for all article sections, statistical data processing, discussion of the study results, writing of the text of the manuscript; *V.E. Tregubova*—execution of experiments for the comparability assessment; *O.B. Ustinnikova*—elaboration of the study concept and design, discussion of the study results, editing of the text of the manuscript; *A.A. Movsesyants*—elaboration of the study concept, approval of the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project № 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Колесникова Оксана Николаевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8664-5800>

kolesnikovao@expmed.ru

Трегубова Варвара Евгеньевна, канд. хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6685-0847>

Tregubova@expmed.ru

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

ustinnikova@expmed.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

movsesyants@expmed.ru

Oksana N. Kolesnikova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8664-5800>

kolesnikovao@expmed.ru

Varvara E. Tregubova, Cand. Sci. (Chem.). ORCID:

<https://orcid.org/0000-0002-6685-0847>

Tregubova@expmed.ru

Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

ustinnikova@expmed.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

movsesyants@expmed.ru

Поступила 28.12.2021

После доработки 25.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 28 December 2021

Revised 25 August 2022

Accepted 26 August 2022